Kit MiSeqDx™ Universal 1.0

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

N. di catalogo DX-103-1001: 2 corse, fino a 96 campioni per kit

Uso previsto

Il Kit MiSeqDx Universal 1.0 Illumina è un set di reagenti e materiali di consumo usato nell'elaborazione dei campioni di DNA genomico umano ottenuto da sangue intero periferico e nel successivo sequenziamento target delle librerie campioni ottenute. I reagenti specifici per l'analita forniti dall'utente sono richiesti per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico. Il Kit MiSeqDx Universal 1.0 è previsto per uso con lo strumento MiSeqDx.

Principi della procedura

La piattaforma MiSeqDx Illumina, composta dal Kit MiSeqDx Universal 1.0 e dallo strumento MiSeqDx, è prevista per il sequenziamento mirato di DNA genomico umano ottenuto da campioni di sangue intero periferico. Usando i reagenti forniti nel Kit MiSeqDx Universal 1.0, il DNA genomico viene elaborato durante la procedura di preparazione delle librerie, che specificatamente amplifica le regioni genomiche previste di ciascun campione usando gli oligonucleotidi personalizzati e progettati dall'utente, aggiungendo inoltre gli indici e le sequenze di cattura della cella a flusso ai prodotti amplificati. Le librerie dei campioni così ottenute sono pronte per il sequenziamento sullo strumento MiSeqDx Illumina.

L'uso del Kit MiSeqDx Universal 1.0 Illumina implica tre procedure principali, per le quali sono forniti tutti i reagenti fatta eccezione per gli oligonucleotidi personalizzati. La prima procedura consiste nella preparazione della libreria, che permette di preparare manualmente i campioni per il sequenziamento. La preparazione della libreria consiste di quattro fasi principali: ibridazione, estensione-ligazione, amplificazione mediante PCR e normalizzazione della libreria. La seconda procedura consiste nel sequenziare il campione preparato mediante la chimica SBS (sequenziamento mediante sintesi) su MiSeqDx. La terza procedura usa il software di analisi per analizzare i risultati del sequenziamento e per generare i file delle identificazioni delle varianti nel formato VCF che contengono le identificazioni delle varianti per ciascun campione. Le informazioni richieste per impostare e analizzare una corsa di sequenziamento, compreso un elenco dei campioni e le relative sequenze indice, sono indicate nel file del foglio campioni in formato *.csv (valori separati da virgola).

Preparazione della libreria

- **Ibridazione**: sottopone a ibridazione un pool di oligonucleotidi a monte e a valle specifici per le regioni di interesse con il campione di DNA genomico. Al termine di questo processo, una procedura di lavaggio in tre fasi, con un filtro in grado di selezionare le dimensioni, rimuove gli oligonucleotidi non legati dal DNA genomico.
- **Estensione-ligazione**: collega gli oligonucleotidi a monte e a valle ibridati. Una DNA polimerasi si estende dagli oligonucleotidi a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti gli oligonucleotidi specifici delle regioni di interesse affiancati da sequenze necessarie per l'amplificazione.
- **Amplificazione mediante PCR**: amplifica i prodotti dell'estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze di indici per il multiplex dei campioni, oltre a sequenze di cattura della cella a flusso

necessarie per la generazione dei cluster su MiSeqDx. Al termine di questo processo, una procedura di pulizia della PCR purifica i prodotti della PCR (indicati come libreria).

- **Normalizzazione della libreria**: normalizza la quantità di ciascuna libreria onde garantire una rappresentazione più equilibrata nel pool finale di librerie. Al termine di questo processo, il pool di librerie viene caricato su MiSeqDx per il sequenziamento mediante la chimica SBS.

Sequenziamento

La chimica SBS utilizza un metodo che fa uso di terminatori reversibili per rilevare le singole basi nucleotidiche man mano che vengono incorporate in filamenti di DNA crescenti. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, alla catena dell'acido nucleico viene aggiunto un solo deossinucleotide trifosfato (dNTP) marcato in fluorescenza. Il nucleotide marcato funge da terminatore per la polimerizzazione, così dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging al fine di identificare la base e quindi sottoposto a scissione enzimatica per consentire l'incorporazione del nucleotide successivo. Poiché tutti e quattro i dNTP legati al terminatore reversibile (A, G, T, C) sono presenti come molecole singole e separate, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Le identificazioni delle basi vengono effettuate direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ogni ciclo di sequenziamento. Il risultato finale è un sequenziamento base per base.

Analisi

Il software integrato per l'analisi primaria RTA (Real Time Analysis) esegue l'analisi delle immagini e l'identificazione delle basi e assegna anche un punteggio qualitativo a ciascuna base per ciascun ciclo di sequenziamento. Al termine dell'analisi primaria, il software MiSeq Reporter sullo strumento MiSeqDx avvia l'analisi secondaria. MiSeq Reporter elabora le identificazioni delle basi generate nel corso dell'analisi primaria e produce informazioni su ciascun campione in base alle informazioni specificate nel foglio campioni. L'analisi secondaria include de-multiplex, generazione di file FASTQ, allineamento, identificazione delle varianti e generazioni di file VCF che contengono le informazioni relative alle varianti individuate in posizioni specifiche in un genoma di riferimento.

Limiti della procedura

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. Questo prodotto è limitato a fornire:
   - Output di sequenziamento di >1 Gb
   - >3 milioni di letture
   - Lunghezza di lettura (in corse paired-end) 2 x 150 bp
   - >75% delle basi con punteggio qualitativo superiore a Q30 (più del 75% delle basi presentano un punteggio qualitativo su scala Phred superiore a 30, il che indica un'accuratezza di identificazione delle basi superiore al 99,9%)
3. Questo sistema è stato convalidato per il rilevamento di SNV e fino a delezioni di 3 basi. La valutazione delle inserzioni di 1 base è stata limitata a 3 diverse inserzioni su 3 cromosomi separati.
4. Il sistema ha problemi nel rilevare le inserzioni o le delezioni di 1 base in tratti omopolimerici (ad es., PolyA).
5. Il sistema MiSeqDx è progettato per fornire risultati qualitativi (vale a dire genotipo).
6. Come per qualsiasi flusso di lavoro basato sull'ibridazione, polimorfismi o mutazioni latenti nelle regioni che legano gli oligonucleotidi possono interessare gli alleli sottoposti a sonda e, di conseguenza, le identificazioni effettuate.
7. La copertura minima raccomandata per l'amplicone necessaria per l'identificazione accurata delle varianti (Q (max_gt | poly_site) >= 100) è di 75x.

Componenti del prodotto

Kit MiSeqDx Universal 1.0 Illumina è composto da:

- Kit MiSeqDx Universal 1.0 (n. di catalogo DX-103-1001)

Reagenti

Reagenti forniti

Il Kit MiSeqDx Universal 1.0 Illumina è stato configurato per due corse con un massimo di 48 campioni per corsa (fino a 96 campioni totali). Vedere le tabelle seguenti per un elenco completo dei reagenti forniti in questo kit.

Kit MiSeqDx Universal 1.0, Scatola 1

Tabella 1 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di ibridazione	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Miscela di estensione-ligazione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice A (A501) - H (A508)	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701) -12 (A712)	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 2 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Diluente normalizzazione libreria	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Controllo interno PhiX	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, Scatola 2

Tabella 3 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Indice	Conservazione
Cartuccia di reagenti MiSeqDx	2 cartucce	Cartuccia monouso che contiene i reagenti per la generazione dei cluster e il sequenziamento da utilizzarsi con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanolo e DMSO < 2%.	tra -25 °C e -15 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, Scatola 3

Tabella 4 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 5 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Microsfere per la pulizia della PCR	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere libreria	1 provetta	1,2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx	2 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, Scatola 4

Tabella 6 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Soluzione SBS MiSeqDx (PR2)	2 flaconi	353,1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Kit MiSeqDx Universal 1.0, Scatola 5

Tabella 7 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra filtro	2 piastre	N.D.	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana di polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 8 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

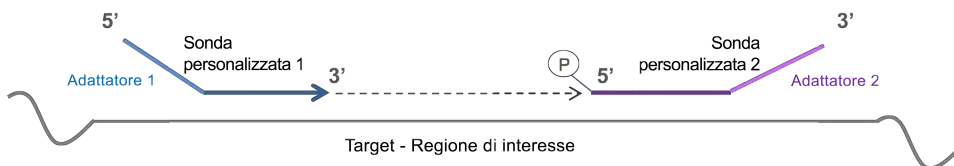
Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di eluizione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione libreria	1 provetta	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Pool di oligonucleotidi personalizzati

Determinati oligonucleotidi primer sono previsti per essere sviluppati dall'utente e non sono inclusi nel kit per la preparazione delle librerie. La Figura 1 illustra i principi di progettazione degli oligonucleotidi personalizzati. La progettazione degli oligonucleotidi deve soddisfare i requisiti seguenti:

- Una coppia di oligonucleotidi personalizzati deve essere progettata per ciascun amplicone: una sonda personalizzata 1 (oligonucleotide specifico per il loco a monte [ULSO]) e una sonda personalizzata 2 (oligonucleotide specifico per il loco a valle [DLSO]).
- Gli oligonucleotidi personalizzati devono circondare la regione di interesse. La regione di interesse deve essere compresa tra 150 e 250 bp per permettere il sequenziamento completo di frammenti con kit da 2 x 150.
- Entrambi gli oligonucleotidi devono ibridare lo stesso filamento di DNA.
- Gli oligonucleotidi personalizzati contengono adattatori specifici Illumina per permettere l'aggiunta di adattatori indici e di sequenziamento mediante PCR.
  - L'adattatore 1 (5′- CAACGATCGTCGAAATTCGC-3′) deve essere posizionato all'estremità 5′ della sonda personalizzata 1 (ULSO).
  - L'adattatore 2 (5′- AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3′) deve essere posizionato all'estremità 3′ della sonda personalizzata 2 (DLSO).
- La sonda personalizzata 2 (DLSO) viene fosforilata all'estremità 5′ per supportare la fase di ligazione dopo l'estensione della sonda personalizzata 1 (ULSO).

Figura 1 Progettazione di oligonucleotidi per il Kit MiSeqDx Universal 1.0

- I parametri seguenti sono raccomandati per la progettazione degli oligonucleotidi:
  - L'intervallo di lunghezza della sonda è compreso tra 22 a 30 nucleotidi (regione specifica per il gene).
  - La dimensione totale dell'amplicone è compresa tra 190 a 290 coppie di basi, inclusi gli adattatori.
  - Il contenuto GC raccomandato per i primer va dal 25% al 70%.
  - L'intervallo di temperatura raccomandato è compreso tra 55 °C e 70 °C.
  - La concentrazione dei primer deve essere 15 nM per oligonucleotide nel pool personalizzato.
  - Dopo la sintesi non è richiesta alcuna purificazione aggiuntiva dell'oligonucleotide. Si raccomanda la desalinazione.
  - Gli oligonucleotidi possono essere diluiti nel tampone TE.
  - Il numero di ampliconi per campioni è compreso tra 16 e 384.
    Se è necessario eseguire il tailing per coprire un'intera regione di interesse, ciascun set di sonde deve avere come target una regione con 1-3 bp sovrapposti con la regione di interesse adiacente. I set di sonde adiacenti devono essere progettati su filamenti alternati per evitare interferenze.
  - La copertura minima raccomandata per amplicone necessaria per l'identificazione delle varianti è di 75x.

Il numero di campioni per corsa deve essere calcolato in base alla copertura minima raccomandata e dipenderà dall'uniformità della copertura del pool di oligonucleotidi personalizzati.

Deve essere creato un file manifest per ciascun pool di oligonucleotidi personalizzato. Il file manifest è un file di testo che contiene le informazioni relative alle regioni genomiche target ed è richiesto per eseguire un'analisi su MiSeq Reporter. Andare al sito Web Illumina per scaricare un modello per il file manifest.

Reagenti pre-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e RNasi

Reagenti post-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Etanolo, 200 proof (vol. 100%) per biologia molecolare
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e RNasi

Conservazione e manipolazione

1. Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa fra 15 °C e 30 °C.
2. I reagenti elencati di seguito sono spediti congelati e rimangono stabili se conservati a una temperatura fra -25 °C e -15 °C fino alla data di scadenza specificata.
   - Tampone di ibridazione
   - Miscela di estensione-ligazione
   - Primer indice A (A501) - H (A508)
   - Primer indice 1 (A701) -12 (A712)
   - PCR polimerasi
   - Master Mix per PCR
   - Diluente normalizzazione libreria
   - Tampone di diluizione libreria
   - Controllo interno PhiX
   - Cartuccia di reagenti MiSeqDx

   Fatta eccezione per la cartuccia di reagenti, i reagenti rimangono stabili per un massimo di sei cicli di congelamento/scongelamento effettuati prima della data di scadenza specificata.

   Non ricongelare la cartuccia di reagenti una volta scongelata. Può essere conservata per un massimo di sei ore a una temperatura fra 2 °C e 8 °C.
3. I reagenti elencati di seguito sono spediti refrigerati e rimangono stabili se conservati a una temperatura fra 2 °C e 8 °C fino alla data di scadenza specifica.
   - Tampone di lavaggio stringente
   - Tampone di lavaggio universale
   - Microsfere per la pulizia della PCR
   - Microsfere libreria
   - Lavaggio di normalizzazione della libreria
   - Soluzione SBS MiSeqDx (PR2)
   - Cella a flusso MiSeqDx
4. I reagenti elencati di seguito sono spediti a temperatura ambiente e rimangono stabili se conservati a tale temperatura fino alla data di scadenza specificata.
   - Tampone di eluizione
   - Piastra filtro
   - Tampone di conservazione libreria
5. Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti forniti possono indicare un deterioramento dei materiali. Non utilizzare i reagenti se si dovessero verificare tali cambiamenti (ad es., variazioni evidenti nel colore del reagente o opacità visibile con contaminazione microbica).

6. I reagenti del Tampone di ibridazione, del Tampone di lavaggio stringente e del Diluente normalizzazione libreria potrebbero formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente, quindi ispezionare a occhio nudo per accertarsi che non vi sia presenza di precipitati.
7. Nella manipolazione delle Microsfere per la pulizia della PCR e delle Microsfere libreria attenersi alle migliori pratiche riportate di seguito:
   - Le microsfere non devono mai essere congelate.
   - Riportarle a temperatura ambiente.
   - Immediatamente prima dell'uso, agitarle bene finché sospensione e colore appaiono omogenei.
   - Dopo aver aggiunto le microsfere miscelare bene il campione pipettando su e giù dieci volte. Per miscelare il campione è possibile utilizzare un agitatore.
   - Incubare la miscela di microsfere/campione a temperatura ambiente per tutta la durata indicata.
   - Seguire le istruzioni per l'uso del supporto magnetico. Attendere che la soluzione diventi trasparente prima di aspirare. Tenere la piastra sul supporto magnetico durante l'aspirazione lenta del surnatante, facendo attenzione a non toccare le microsfere separate.
8. La piastra di amplificazione mediante PCR può restare sul termociclatore per tutta la notte, oppure può essere conservata ad una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di due giorni. Prima di conservare la piastra a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C sigillarla bene.
9. Non congelare le Microsfere libreria o miscelarle con il Diluente normalizzazione libreria se non vengono utilizzate immediatamente.
10. La piastra completa di normalizzazione della libreria può essere conservata a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.
11. La libreria di ampliconi raggruppati in pool può essere conservata tra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.
12. Caricare immediatamente nella cartuccia del reagente un pool di ampliconi diluiti appena preparati. Se conservato, il pool di ampliconi diluiti può comportare una riduzione significativa della densità dei cluster.

Apparecchiatura e materiali

Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

1. Strumento **MiSeqDx**, n. catalogo DX-410-1001
2. **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n. di catalogo FC-130-1005
3. **Kit TruSeq Index Plate Fixture& Collar,** n. di catalogo FC-130-1007
4. **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

1. **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
   - Intervallo di temperatura: ambiente +5 °C - 99 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
2. **Incubatore di campioni**: è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   - Intervallo di temperatura: tra 10 ℃ e 100 ℃
   - Regolazione della temperatura: ± 0,2 °C
3. **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.

4 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette mono-canale che multi-canale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
5 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
 — Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
 NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
 — Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
 — Bacinella per soluzione, in PVC, senza DNAasi/RNAasi (vaschetta)
 — Sigillo adesivo in alluminio
 — Sigillo per piastre PCR appropriato
 — Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

1 **Termociclatore**: è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 — Intervallo di controllo della temperatura: tra 4 ℃ e 99 ℃
 — Accuratezza del controllo: ± 0,25 °C da 35 °C a 99 °C
2 **Agitatore per micropiastre**: nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario un agitatore di micropiastre. L'agitatore di piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 — Velocità massima di miscelazione: 3.000 rpm (giri/min)
 — Intervallo di velocità di miscelazione: 200 - 3.000 rpm (giri/min)
3 **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. (come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga). Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2400 × g) è accettabile.
4 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
 — Intervallo di temperatura: ambiente +5 °C - 99 ℃
 — Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
5 **Supporto magnetico**: è necessario un supporto magnetico per una piastra a 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.
6 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. (come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set). L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette mono-canale che multi-canale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
7 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
 — Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
 NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
 — Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
 — Provette coniche, 15 ml
 — Provette per microcentrifuga Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)
 — Striscia a otto provette per PCR
 — Bacinella per soluzione, in PVC, senza DNAasi/RNAasi (vaschetta)
 — Sigillo adesivo in alluminio
 — Sigillo adesivo per piastre
 — Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

NOTA
Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.

1. Possono essere utilizzati campioni di sangue intero prelevati in provette K_2 EDTA.
2. I campioni di sangue intero possono essere conservati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a 2-8 °C o fino a 30 giorni se congelati fra -15 °C e -25 °C.
3. I campioni di sangue intero possono essere trasportati per non più di sette giorni a temperatura ambiente, fino a 30 giorni a 2-8 °C, o fino a 30 giorni se congelati fra -25 °C e -15 °C. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali, statali o locali per il trasporto di agenti eziologici.
4. Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni dei kit allorché il DNA genomico è stato sottoposto a sei cicli di congelamento/scongelamento.
5. Non sono stati osservati eventi avversi sulle prestazioni dei kit in presenza di campioni di sangue intero con elevati tassi di bilirubina, colesterolo, emoglobina o trigliceride.

Avvertenze e precauzioni

ATTENZIONE
La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico o di un medico autorizzato dalla legge dello stato in cui esercita, ad usare o ad ordinare l'uso del dispositivo.

1. Alcuni componenti di questo kit contengono formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 3. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
2. Alcuni componenti di questo kit contengono il 2-mercaptoetanolo, un agente riducente. Per maggiori informazioni, vedere *Reagenti* a pagina 3. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Utilizzarlo in un'area ben ventilata e smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati conformemente alle norme di sicurezza in vigore localmente. Per informazioni, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.
3. Maneggiare tutti campioni come se fossero agenti potenzialmente infettivi.
4. Il mancato rispetto delle procedure descritte può produrre risultati errati o una riduzione significativa della qualità del campione.
5. Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle zone designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del kit indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del kit lavarsi bene le mani.
6. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione. Non scambiare i componenti di diversi lotti di kit. I lotti di kit sono identificati sull'etichetta della confezione.
7. Conservare i componenti dei kit alla temperatura indicata e in zone designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
8. Cicli ripetuti di congelamento-scongelamento (fino a 6) dei componenti dalla scatola 1 non compromettono l'integrità del kit.
9. Onde evitare il degrado del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori di sodio ipoclorito si siano dissipati completamente prima di iniziare il protocollo.
10. È necessario adottare idonee pratiche di laboratorio e una valida igiene per impedire la contaminazione di reagenti, strumenti e campioni di DNA genomico con i prodotti della PCR. La contaminazione da PCR può produrre risultati inesatti e inaffidabili.

11 Al fine di prevenire la contaminazione, accertarsi che le zone di pre-amplificazione e post-amplificazione siano dotate delle apposite attrezzature (ad es. pipette, punte di pipette, agitatori e centrifughe).
12 Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte di pipette nuove fra un campione e l'altro e fra le erogazioni di reagenti. Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato. Non agitare le piastre. L'utilizzo di punte dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.
13 Le combinazioni indice-campione devono corrispondere esattamente a quelle del foglio campioni. La non corrispondenza fra il foglio campioni e il layout della piastra risulterà in una perdita di identificazione dei campioni positivi e nella refertazione di risultati errati.
14 Preparare sempre al momento l'etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
15 Assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti durante le fasi di lavaggio. L'etanolo residuo può influire sui risultati.
16 Rispettare il tempo di asciugatura indicato dopo la fase del supporto magnetico al fine di garantire che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
17 Non mescolare il pool di oligonucleotidi personalizzati e il Tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il pool di oligonucleotidi personalizzati diventa instabile, anche se conservato congelato.
18 L'utilizzo di termociclatori a raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente) non è consigliato per la fase di ibridazione. La fase di raffreddamento passivo è cruciale per un'adeguata ibridazione.
19 Aggiungere sempre PCR polimerasi al Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro combinata.
20 Durante la fase di normalizzazione della libreria, è estremamente importante risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso di MiSeqDx.
21 Rispettare i tempi di incubazione specificati per la fase di normalizzazione della libreria. Un'incubazione inadeguata può influire sulla rappresentazione della libreria e sulla densità dei cluster.
22 A causa del numero di trasferimenti della piastra e della conseguente potenziale contaminazione, è importante fare molta attenzione per assicurare che il contenuto dei pozzetti rimanga totalmente al loro interno. Non far schizzare il contenuto.
23 L'input di DNA di 250 ng raccomandato permette la variazione della quantità del DNA; le prestazioni del kit si basano su questo livello di input.

Note sulle procedure

1 Illumina ritiene necessario che per ogni corsa, definita come una serie di campioni elaborati in parallelo, vengano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un controllo negativo (NTC o No Template Control, controllo senza templato). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una variazione nota nella regione di interesse.
2 Prima di iniziare il protocollo del Kit MiSeqDx Universal 1.0, estrarre e quantificare il DNA.
3 È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione del DNA approvato.
4 Quantificare il DNA con uno spettrofotometro. Verificare che il rapporto A260/A280 del campione di DNA sia > 1,5. Normalizzare il campione di DNA a 50 ng/µl. Per ciascun campione sono necessari 5 µl di DNA genomico (250 ng totali).

Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice

Per il Kit MiSeqDx Universal 1.0 Illumina, il rendimento dei campioni per corsa di MiSeqDx può essere tra 8 e 48 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza dell'indice.

NOTA
Per la massima efficienza di rendimento, eseguire la preparazione della libreria per un massimo di 96 campioni e quindi dividere i campioni in due corse di sequenziamento con un massimo di 48 campioni ciascuno.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni ciclo deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ogni canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ogni base dell'indice letta sottoposta a sequenziamento, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento della Lettura indici.

Per scegliere le combinazioni di primer indice per corse a 48 o 96 campioni, vedere la Tabella 9.

Tabella 9 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 48 campioni o 96 campioni

Righe A-H	Colonne 1-6	Colonne 7-12
Primer indice A (A501)	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 6 (A706)
Primer indice B (A502)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 7 (A707)
Primer indice C (A503)	Primer indice 3 (A703)	Primer indice 8 (A708)
Primer indice D (A504)	Primer indice 4 (A704)	Primer indice 9 (A709)
Primer indice E (A505)	Primer indice 5 (A705)	Primer indice 11 (A711)
Primer indice F (A506)	Primer indice 10 (A710)	Primer indice 12 (A712)
Primer indice G (A507)	--	--
Primer indice H (A508)	--	--

Se si sequenziano meno di 48 campioni in una corsa di sequenziamento, selezionare gli indici appropriati in base alle relative sequenze per conservare il bilanciamento cromatico nei canali verde e rosso. Vedere la Tabella 11 e la Tabella 12. Come requisito minimo, le corse con 8 o 48 campioni devono includere una combinazione di primer di indicizzazione identificata nella Tabella 10.

Per elaborare in maniera accurata corse più piccole, devono essere presenti almeno otto campioni. Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati o qualsiasi campione di DNA genomico umano. Per il set minimo di indici bilanciati per colore da usare nelle corse di sequenziamento a 8 campioni, vedere la Tabella 10.

Tabella 10 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

	Primer indice 1 (A701)	Primer indice 2 (A702)	Primer indice 10 (A710)
Primer indice C (A503)	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Primer indice D (A504)	Campione 4	Campione 5	Campione 6
Primer indice E (A505)	Campione 7	Campione 8	--

Sequenze dei primer indice

Tabella 11 Sequenze per Primer indice A (A501) - H (A508)

Primer indice	Sequenza
Primer indice A (A501)	TGAACCTT
Primer indice B (A502)	TGCTAAGT
Primer indice C (A503)	TGTTCTCT
Primer indice D (A504)	TAAGACAC

Primer indice	Sequenza
Primer indice E (A505)	CTAATCGA
Primer indice F (A506)	CTAGAACA
Primer indice G (A507)	TAAGTTCC
Primer indice H (A508)	TAGACCTA

Tabella 12 Sequenze per Primer indice 1 (A701) -12 (A712)

Primer indice	Sequenza
Primer indice 1 (A701)	ATCACGAC
Primer indice 2 (A702)	ACAGTGGT
Primer indice 3 (A703)	CAGATCCA
Primer indice 4 (A704)	ACAAACGG
Primer indice 5 (A705)	ACCCAGCA
Primer indice 6 (A706)	AACCCCTC
Primer indice 7 (A707)	CCCAACCT
Primer indice 8 (A708)	CACCACAC
Primer indice 9 (A709)	GAAACCCA
Primer indice 10 (A710)	TGTGACCA
Primer indice 11 (A711)	AGGGTCAA
Primer indice 12 (A712)	AGGAGTGG

Istruzioni per l'uso

Preparazione del foglio campioni per MiSeqDx

1. Nella schermata Welcome (Benvenuto) di Worklist Manager Illumina, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro).
2. Nel campo Test Type (Tipo di test), selezionare **MiSeqDx Universal**.
3. Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere il nome per il foglio campioni.
   - Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, Software operativo MiSeq (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni.
   - Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) in Software operativo MiSeq (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
4. [Opzionale] Immettere una descrizione per identificare la corsa.
5. Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa.
6. Selezionare **Next** (Avanti).

Inserimento di informazioni sui campioni

1 Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ogni pozzetto contenente campione:
   a **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco.
   b **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore dell'indice che verrà utilizzato per ogni Lettura indici.
   c **Manifest** (Manifest): specificare in nome del file manifest che contiene le informazioni relative ai campioni in quel determinato pozzetto.
   Per maggiori informazioni sul file manifest, vedere *Pool di oligonucleotidi personalizzati* a pagina 5.
2 [Opzionale] Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.
3 [Opzionale] Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).
4 Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.
5 Selezionare **Fine**.

Ibridizzazione del pool di oligonucleotidi

Preparazione

1 Portare a temperatura ambiente il pool di oligonucleotidi personalizzati, il Tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomici e il campione di controllo positivo.
2 Inserire in un agitatore il pool di oligonucleotidi personalizzati e il Tampone di ibridazione e agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.
3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.
4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C.
5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da IWM.

Procedura

1 Impostare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **HYB**).
2 Aggiungere 5 µl di campione o controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) ai pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.
3 Aggiungere 5 µl del pool di oligonucleotidi personalizzati a tutti i pozzetti contenenti il DNA genomico.
4 Aggiungere 40 µl di Tampone di ibridazione a ogni campione nella piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare.
5 Sigillare la piastra **HYB** e centrifugare 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
6 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.
7 Ridurre la temperatura del blocco termico a 40 °C e continuare a incubare fino a quando il blocco di calore raggiunge 40 °C (circa 80 minuti).
   Il raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per 2 ore.

Rimozione degli oligonucleotidi non legati

Preparazione

1. Portare la Miscela di estensione-ligazione, il Tampone di lavaggio stringente e il Tampone di lavaggio universale a temperatura ambiente e agitare brevemente.
2. Assemblare l'unità piastra filtro (di seguito denominata **FPU**) nell'ordine dall'alto verso il basso: coperchio, piastra filtro, colletto adattatore e piastra MIDI.
3. Pre-lavare la membrana della piastra filtro come segue:
   a. Dispensare 45 µ di Tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
   b. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

Procedura

1. Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2. Trasferire tutto il volume di ciascun campione (circa 55 µl) nei corrispondenti pozzetti della piastra filtro.
3. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
4. Lavare la piastra filtro come segue:
   a. Dispensare 45 µ di Tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
5. Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.

NOTA
Se il tampone di lavaggio non asciuga completamente, centrifugare di nuovo a 2.400 x g a 20 °C finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

6. Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide), quindi riassemblare l'**FPU**.
7. Dispensare 45 µ di Tampone di lavaggio universale in ciascun pozzetto contenente il campione.
8. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 10 minuti.

NOTA
Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Ripetere la centrifugazione se necessario.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Procedura

1. Aggiungere 45 µl di Miscela di estensione-ligazione a ogni pozzetto di campione della piastra filtro.
2. Sigillare la piastra filtro con foglio di allumino adesivo e quindi coprire il coperchio.
3. Incubare l'unità **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.

Amplificazione mediante PCR

Preparazione

1. Preparare 0,05 N di NaOH freschi.
2. Determinare i primer indice da utilizzare in base all'immagine del grafico stampata da Worklist Manager Illumina.
3. Portare Master Mix per PCR e i primer indice appropriati a temperatura ambiente. Agitare ogni provetta scongelata per miscelare e quindi centrifugare brevemente le provette.
4. Impostare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **AMP**).
5. Aggiungere i primer indice alla piastra AMP come segue:
   a. Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati [A (A501) – H (A508)] nel pozzetto appropriato in una colonna della piastra **AMP**.
   b. Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.

c Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati [1 (A701) – 12 (A712)] nella riga appropriata della piastra **AMP**. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.***
d Smaltire i tappi arancioni originali e applicare tappi arancioni nuovi.

6 Preparare una soluzione di lavoro per la PCR Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
  a Per 96 campioni, aggiungere 56 µl di PCR polimerasi a 2,8 ml di Master Mix per PCR.
  b Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro per la PCR preparata per miscelarla.

  La soluzione di lavoro per la PCR si mantiene stabile a temperatura ambiente per 10 minuti.

Procedura

1 Rimuovere l'**FPU** dall'incubatore e rimuovere il sigillo in alluminio.
2 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2400 x g a 20 °C per 2 minuti.
3 Aggiungere 25 µl di 0,05 N di NaOH a ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Pipettare il NaOH su e giù 5–6 volte.
4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.
5 Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire 22 µl della soluzione di lavoro per PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice.
6 Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP come segue:
  a Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5–6 volte.
  b Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.
  c Pipettare delicatamente su e giù 5–6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per PCR.
  d Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra AMP in modo simile. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.***
7 Sigillare la piastra **AMP** e assicurare con un rullo di gomma.
8 Centrifugare a 1000 x g a 20 °C per 1 minuto.
9 Trasferire la piastra AMP sull'area di post-amplificazione.
10 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
  — 95 °C per 3 minuti
  — 25 cicli di:
    — 95 °C per 30 secondi
    — 62 °C per 30 secondi
    — 72 °C per 60 secondi
  — 72 °C per 5 minuti
  — Mantenere a 10 °C

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra **AMP** può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per massimo 48 ore.

Pulizia mediante PCR

Preparazione

1 Portare le Microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
2 Preparare etanolo all'80% fresco dall'etanolo assoluto.

Procedura

1 Centrifugare la piastra AMP a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
2 Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **CLP**).
3 Capovolgere 10 volte le Microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente e quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.

4 Aggiungere 45 µl di Microsfere per la pulizia della PCR a ogni pozzetto di campione della piastra **CLP**.
5 Trasferire l'intero prodotto per PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**.
6 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.
7 Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
8 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è scomparso.
9 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
10 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere come segue:
  a Dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ogni pozzetto contenente il campione.
  b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
  c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
11 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.
12 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.
13 Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
14 Dispensare 30 µ di Tampone di eluizione in ciascun campione e agitare brevemente.
15 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti. Dopo l'agitazione, controllare che i campioni siano risospesi. Altrimenti, ripetere questo passaggio.
16 Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
17 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
18 Impostare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **LNP**).
19 Trasferire 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**.
20 [Opzionale] Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** a una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti per PCR puliti possono essere usati per scopi di ricerca ed eliminazione guasti in caso di problemi a carico dei campioni.

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto. La piastra è stabile per un massimo di 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione della libreria

Preparazione

1 Preparare 0,1 N di NaOH freschi.
2 Portare Diluente normalizzazione libreria, Microsfere libreria e Lavaggio di normalizzazione della libreria a temperatura ambiente.
3 Agitare Diluente normalizzazione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
4 Agitare Microsfere libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

1 Miscelare Diluente normalizzazione libreria e Microsfere libreria in una provetta conica fresca da 15 ml come segue:

NOTA
Se si stanno analizzando meno di 24 campioni, utilizzare una provetta nuova da 1,5 ml.

  a Per 96 campioni, dispensare 4,4 ml di Diluente normalizzazione libreria.
  b Pipettare Microsfere libreria su e giù 10 volte per risospendere.

NOTA
È fondamentale risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso.

   c Per 96 campioni, pipettare 800 µl di Microsfere libreria nella provetta contenente Diluente normalizzazione libreria.
   d Miscelare capovolgendo la provetta 15–20 volte.
2 Dispensare 45 µl della soluzione di lavoro di Diluente normalizzazione libreria/Microsfere libreria combinata in ogni pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie.
3 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.
4 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è scomparso.
5 Con la piastra **LNP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
6 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con Lavaggio di normalizzazione della libreria come segue:
   a Dispensare 45 µ di Lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
   c Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
   d Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
7 Ripetere la procedura Lavaggio di normalizzazione della libreria come descritto nella fase precedente.
8 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di Lavaggio di normalizzazione della libreria.
9 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto.
10 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
11 Durante l'eluizione di 5 minuti, impostare una nuova piastra PCR con 96 pozzetti (di seguito definita piastra **SGP**).
12 Dispensare 30 µl di Tampone di conservazione libreria a ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.
13 Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospendere le microsfere, quindi agitare per altri 5 minuti.
14 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
15 Trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.
16 Sigillare la piastra **SGP** e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

Creazione di pool di librerie

Preparazione del pool di librerie

1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
2 In un portaghiaccio, preparare un bagno di acqua e ghiaccio. Raffreddare il Tampone di diluizione libreria nel bagno di acqua e ghiaccio.
3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagente MiSeqDx

Preparazione di una soluzione di diluizione fresca di NaOH

ATTENZIONE
L'utilizzo di una soluzione di diluizione fresca di NaOH è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione dei cluster sul dispositivo MiSeqDx.

1 Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga:
  - Acqua priva di DNAsi e RNAsi (900 µl)
  - 1,0 N di NaOH (100 µl)
2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.

Denaturazione e diluizione Controllo interno PhiX

1 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del Controllo interno PhiX a 2 nM:
  - Libreria del Controllo interno PhiX da 10 nM (2 µl)
  - 1X tampone TE (8 µl)
2 Combinare i seguenti volumi per ottenere una libreria del Controllo interno PhiX da 1 nM:
  - Libreria del Controllo interno PhiX da 2 nM (10 µl)
  - 0,1 N NaOH (10 µl)
3 Inserire brevemente in un agitatore per miscelare la soluzione della libreria del Controllo interno PhiX da 1 nM.
4 Centrifugare la soluzione del templato a 280 x g a 20 °C per 1 minuto.
5 Incubare per 4,5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la libreria del Controllo interno PhiX in filamenti singoli.
6 Aggiungere il seguente volume di Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato nella provetta contenente la libreria del Controllo interno PhiX denaturata per ottenere una libreria del Controllo interno PhiX da 20 pM.
  - Libreria del Controllo interno PhiX denaturata (20 µl)
  - Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (980 µl)

Preparazione della cartuccia di reagenti

1 Scongelare la Cartuccia di reagenti MiSeqDx in un bagnomaria contenente abbastanza acqua deionizzata a temperatura ambiente così da immergere la base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.
2 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare a bagnomaria a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a completo scongelamento.
3 Rimuovere la cartuccia dal bagnomaria e batterla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati e poi ispezionare visivamente tutti i serbatoi per accertarsi che siano scongelati.

NOTA
È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

2 Ispezionare visivamente il reagente nella posizione 1 per accertarsi che sia ben miscelato e privo di precipitati.
3 Battere delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.

NOTA
I tubi dei pescanti del MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle.

4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a 6 ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

1 Portare il Tampone di diluizione libreria a temperatura ambiente. Agitare il Tampone di diluizione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelarla fino a raggiungere la temperatura ambiente.
3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1000 x g a 20°C per 1 minuto.
4 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **PAL**).
5 Determinare i campioni da raggruppare in pool per il sequenziamento. Per il sequenziamento è possibile utilizzare al massimo 48 campioni contemporaneamente.
6 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, mescolare ciascuna libreria da sequenziare pipettando su e giù per 3-5 volte.
7 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP**, colonna per colonna, a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.

NOTA
Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP** fra -25 °C e -15 °C. La piastra **SGP** sigillata rimane stabile per un massimo di 3 giorni.

8 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL**.
9 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (d'ora in avanti indicata come provetta **DAL**).
10 Dispensare 585 µl di Tampone di diluizione libreria nella provetta **DAL**.
11 Dispensare 6 µl di Controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
12 Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente Tampone di diluizione libreria. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
13 Mescolare la **DAL** agitando la provetta molto velocemente.
14 Centrifugare la provetta **DAL** a 1000 x g a 20 °C per 1 minuto.
15 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 ℃ per 2 minuti.
16 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno di acqua e ghiaccio.
17 Tenere la provetta **DAL** nel bagno di acqua e ghiaccio per 5 minuti.

Caricamento delle librerie di campioni nella cartuccia

1 Utilizzare la punta di una pipetta pulita e vuota da 1 ml per forare la capsula di alluminio che sigilla il serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni).
2 Pipettare 600 µl delle librerie di campioni nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Caricamento campioni). Fare attenzione a evitare di toccare la capsula sigillante durante l'erogazione del campione.
Una volta caricato il campione, verificare la presenza di bolle d'aria nel serbatoio. In caso di presenza di bolle d'aria, picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco in modo da farle fuoriuscire.
3 Passare direttamente alla procedura di impostazione della corsa usando l'interfaccia Software operativo MiSeq (MOS).

Impostazione della corsa

1 Eseguire l'accesso al Software operativo MiSeq (MOS).
2 Selezionare **Sequence** (Sequenziamento).

Si aprono una serie di schermate di configurazione nell'ordine seguente: Select Run Type, Load Flow Cell, Load Reagents, Review e Pre-Run Check (Selezione tipo di corsa, Caricamento cella a flusso, Caricamento reagenti, Revisione e Verifica pre-corsa).

3 Selezionare **Diagnostic Run** (Corsa diagnostica).
4 Quando viene visualizzata la schermata Load Flow Cell (Carica cella a flusso), pulire e quindi caricare la cella a flusso.
5 Chiudere il coperchio a scatto e lo sportello dello scomparto della cella a flusso.
Il coperchio a scatto e lo sportello dello scomparto della cella a flusso devono essere chiusi per poter avviare la corsa. Una volta eseguito il caricamento della cella a flusso, il software legge l'etichetta RFID e ne registra il contenuto. Se l'etichetta RFID viene letta correttamente, nell'angolo inferiore destro della schermata appare un messaggio di conferma.
6 Quando viene visualizzata la schermata Load Reagents (Caricamento reagenti), svuotare il flacone degli scarti, caricare un flacone della Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) e quindi caricare la cartuccia di reagenti.
Quando il flacone di soluzione SBS MiSeqDx (PR2) e la cartuccia di reagenti sono caricati, il software legge e registra le etichette RFID. Se l'etichetta RFID viene letta correttamente, nell'angolo inferiore destro della schermata appare un messaggio di conferma.
7 Selezionare il foglio campioni appropriato.
Per impostazione predefinita, il software cercherà il file del foglio campioni con un nome che corrisponde al numero del codice a barre della cartuccia di reagenti caricata sullo strumento.
8 Confermare le impostazioni della corsa e i risultati della verifica pre-corsa.
9 Avviare la corsa.
La schermata Sequencing (Sequenziamento) si apre all'inizio della corsa. La schermata fornisce una rappresentazione visiva dell'avanzamento della corsa, che comprende le intensità e i punteggi qualitativi (Q-scores).

Procedure per il controllo qualità

Le buone pratiche di laboratorio dispongono che in ogni corsa siano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un campione di controllo negativo (non templato). Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con varianti note nella regione di interesse.

- Se un controllo non templato genera una percentuale di identificazione > 10% significa che si è verificata una contaminazione nel controllo non templato. Il protocollo viene considerato non riuscito e deve essere ripetuto completamente, a cominciare dalla preparazione delle librerie.
- Il campione di controllo positivo deve generare il risultato previsto. Se il controllo positivo genera un risultato diverso da quello previsto significa che si è verificato un possibile errore nel monitoraggio del campione oppure una registrazione errata dei primer di indicizzazione. Il protocollo deve essere ripetuto completamente a cominciare dalla preparazione delle librerie.

Caratteristiche delle prestazioni

Accuratezza

Sono stati condotti due studi separati per valutare l'accuratezza della piattaforma MiSeqDx.

Studio 1

Questo studio usa un saggio rappresentativo progettato per interrogare una varietà di geni che coprono 24.434 basi su 19 diversi cromosomi e che contengono potenzialmente gli esoni rilevanti dal punto di vista clinico. I 13 campioni unici usati in questo studio appartengono a due genitori e 11 bambini. Questi campioni sono spesso stati sottoposti a sequenziamento da laboratori multipli e metodi di sequenziamento multipli. Sei campioni sono femminili e sette sono maschili. L'accuratezza è stata determinata per le varianti di singolo nucleotide (SNV) confrontando i dati dello studio su un database dei riferimenti ben caratterizzati. Le sequenze di riferimento del database erano derivate dalla combinazione di metodologie di sequenziamento multiple, dati disponibili pubblicamente e informazioni ereditarie. Per valutare l'accuratezza del sistema la tabella seguente è stata compilata in base ai dati ottenuti dalla prima corsa nello studio. Per questo studio non sono stati ripetuti test.

I risultati ottenuti da questo studio sono presentati qui di seguito.

Tabella 13 Studio 1 - Accuratezza dei dati a livello di ampliconi per la piattaforma MiSeqDx

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
1	1	132	Poly C (5), 63% GC	13	15	132	0	132	0	100
2	1	128	Poly T (5)	13	15	128	0	128	0	100
3	2	133	-	13	15	133	0	133	0	100
4	2	119	-	13	15	119	0	119	0	100
5	2	127	Poly T (5)	13	15	127	0	127	0	100
6	2	135	Poly A (6)	13	15	135	0	135	0	100
7	2	122	Poly T (5), Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
8	2	110	Poly T (5)	13	15	110	0	110	0	100
9[8]	2	131	Poly A (14)	13	15	130-131	0	130-131	9	99.54
10	2	117	-	13	15	117	0	117	0	100
11	2	121	-	13	15	121	0	121	0	100
12	2	114	-	13	15	114	0	114	0	100
13	2	129	Poly A (5)	13	15	129	0	129	0	100
14	3	131	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	131	0	131	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
15	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
16	3	130	-	13	15	130	0	130	0	100
17	3	117	-	13	15	117	0	117	0	100
18	3	136	Poly T (5)	13	15	136	0	136	0	100
19	3	131	Poly T (5), SNV	13	15	131	0	131	0	100
20	3	123	Poly A (5)	13	15	123	0	123	0	100
21	3	117	Poly A (6), Poly T (5), Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	117	0	117	0	100
22	3	119	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	119	0	119	0	100
23	3	120	-	13	15	120	0	120	0	100
24	3	129	Poly T (5)	13	15	129	0	129	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
25	4	133	Poly C (7), 66% GC	13	15	133	0	133	0	100
26	4	135	Poly C (5), 69% GC	13	15	135	0	135	0	100
27	4	123	SNV	13	15	123	0	123	0	100
28	4	134	-	13	15	134	0	134	0	100
29	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
30	4	121	Poly A (5), SNV	13	15	121	0	121	0	100
31	4	125	-	13	15	125	0	125	0	100
32	4	134	Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
33	4	118	-	13	15	118	0	118	0	100
34	4	122	Poly A (5)	13	15	122	0	122	0	100
35	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100
36	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
37	4	128	Poly T (6)	13	15	128	0	128	0	100
38	4	131	-	13	15	131	0	131	0	100

Amplicon e	Cromosom a	Dimension e del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicon e	N. di campion i unici	N. totale di campion i analizzat i[2]	N. di identificazion i per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazion i non riuscite[4]	N. di identificazion i corrette per campione[5]	N. di identificazion i errate[6]	% di identificazio ni corrette[7]
39	4	129	Poly A (5), Poly T (5), SNV	13	15	129	0	129	0	100
40	4	133	Poly T (5), SNV	13	15	133	0	133	0	100
41	4	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
42	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
43	4	135	-	13	15	135	0	135	0	100
44	4	122	-	13	15	122	0	122	0	100
45	4	117	-	13	15	117	0	117	0	100
46[9]	4	124	-	13	15	125	0	125	0	100
47	4	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
48	4	128	Poly A (7)	13	15	128	0	128	0	100
49	4	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
50	4	133	-	13	15	133	0	133	0	100
51	4	112	-	13	15	112	0	112	0	100
52	4	129	-	13	15	129	0	129	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
53	4	126	-	13	15	126	0	126	0	100
54	4	132	-	13	15	132	0	132	0	100
55	5	131	-	13	15	131	0	131	0	100
56	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
57	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
58	5	119	-	13	15	119	0	119	0	100
59	5	118	-	13	15	118	0	118	0	100
60	5	112	-	13	15	112	0	112	0	100
61	5	120	-	13	15	120	0	120	0	100
62	5	120	Poly A (5)	13	15	120	0	120	0	100
63	5	115	CT(5)	13	15	115	0	115	0	100
64	5	112	SNV	13	15	112	0	112	0	100
65	5	135	Poly T (6)	13	15	135	0	135	0	100
66	5	131	63% GC	13	15	131	0	131	0	100
67	5	121	-	13	15	121	0	121	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
68	5	132	Poly A (6), Poly T (8)	13	15	132	0	132	0	100
69	7	133	-	13	15	133	0	133	0	100
70	7	120	60% GC	13	15	120	0	120	0	100
71	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100
72	7	126	Poly A (5), 59% GC	13	15	126	0	126	0	100
73	7	134	-	13	15	134	0	134	0	100
74	7	122	Poly C (5), 63% GC	13	15	122	0	122	0	100
75	7	127	59% GC; SNV	13	15	127	0	127	0	100
76	7	123	-	13	15	123	0	123	0	100
77	7	125	-	13	15	125	0	125	0	100
78	7	133	Poly A (5), Poly T (5)	13	15	133	0	133	0	100
79	7	116	-	13	15	116	0	116	0	100
80	7	135	-	13	15	135	0	135	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
81	7	118	-	13	15	118	0	118	0	100
82	7	136	67% GC	13	15	136	0	136	0	100
83	7	131	58% GC	13	15	131	0	131	0	100
84	7	119	Poly G (6), 61% GC	13	15	119	0	119	0	100
85	7	122	Poly T (5)	13	15	122	0	122	0	100
86	7	123	Poly A (6)	13	15	123	0	123	0	100
87	8	127	60% GC	13	15	127	0	127	0	100
88	8	129	57% GC	13	15	129	0	129	0	100
89	9	130	Poly T (5)	13	15	130	0	130	0	100
90	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100
91	9	119	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	119	0	119	0	100
92	9	121	-	13	15	121	0	121	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
93	9	117	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	117	0	117	0	100
94	9	114	-	13	15	114	0	114	0	100
95[10]	9	129	Poly A (14)	13	15	130	0	129 (di 130)	15	99.23
96	9	114	Regioni omologhe su un cromosoma diverso; SNV	13	15	114	0	114	0	100
97	9	122	-	13	15	122	0	122	0	100
98	9	127	Poly A (5), Poly C (5)	13	15	127	0	127	0	100
99	9	133	-	13	15	133	0	133	0	100
100	9	138	64% GC	13	15	138	0	138	0	100
101	9	139	-	13	15	139	0	139	0	100
102	9	116	-	13	15	116	0	116	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
103	9	133	Poly A (5), 57% GC	13	15	133	0	133	0	100
104	9	138	57% GC	13	15	138	0	138	0	100
105	9	136	Poly C (5), 67% GC	13	15	136	0	136	0	100
106	9	118	70% GC	13	15	118	0	118	0	100
107	10	128	62% GC	13	15	128	0	128	0	100
108	10	120	60% GC	13	15	120	0	120	0	100
109	10	139	58% GC; SNV	13	15	139	0	139	0	100
110	10	118	57% GC	13	15	118	0	118	0	100
111	10	123	Poly T (5)	13	15	123	0	123	0	100
112	10	121	-	13	15	121	0	121	0	100
113	10	129	26% GC	13	15	129	0	129	0	100
114	10	122	-	13	15	122	0	122	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
115	10	124	Poly T (5); Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	124	0	124	0	100
116	10	135	CA(4)	13	15	135	0	135	0	100
117	10	135	Poly A (6); Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	135	0	135	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	13	15	119	0	119	0	100
119	10	125	-	13	15	125	0	125	0	100
120	10	131	-	13	15	131	0	131	0	100
121	10	117	-	13	15	117	0	117	0	100
122	10	116	-	13	15	116	0	116	0	100
123	10	129	58% GC	13	15	129	0	129	0	100
124	11	117	Poly T (10)	13	15	117	0	117	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
125	11	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
126	11	113	Poly A (5)	13	15	113	0	113	0	100
127	11	129	-	13	15	129	0	129	0	100
128	11	121	Poly T (5)	13	15	121	0	121	0	100
129	11	123	-	13	15	123	0	123	0	100
130	11	127	Poly A (6)	13	15	127	0	127	0	100
131	11	136	Poly T (6)	13	15	136	0	136	0	100
132	11	132	Poly T (5)	13	15	132	0	132	0	100
133	11	115	-	13	15	115	0	115	0	100
134	11	117	Poly T (8); 19% GC	13	15	117	0	117	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	13	15	134	0	134	0	100
136	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
137	11	133	26% GC; SNV	13	15	133	0	133	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
138	11	137	Poly T (8); SNV	13	15	137	0	137	0	100
139	11	131	Poly A (5)	13	15	131	0	131	0	100
140	12	131	-	13	15	131	0	131	0	100
141	12	128	-	13	15	128	0	128	0	100
142	12	133	Poly A (5)	13	15	133	0	133	0	100
143	12	136	-	13	15	136	0	136	0	100
144	12	124	-	13	15	124	0	124	0	100
145	12	122	59% GC	13	15	122	0	122	0	100
146	13	122	-	13	15	122	0	122	0	100
147	13	116	Poly C (5)	13	15	116	0	116	0	100
148	13	133	-	13	15	133	0	133	0	100
149	13	117	SNV	13	15	117	0	117	0	100
150	13	124	Poly T (6)	13	15	124	0	124	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26% GC	13	15	123	0	123	0	100
152	13	115	Poly A (5)	13	15	115	0	115	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
153	13	125	-	13	15	125	0	125	0	100
154	13	121	-	13	15	121	0	121	0	100
155	13	123	-	13	15	123	0	123	0	100
156	13	114	-	13	15	114	0	114	0	100
157	13	119	-	13	15	119	0	119	0	100
158	14	122	58% GC	13	15	122	0	122	0	100
159	16	122	-	13	15	122	0	122	0	100
160	16	121	-	13	15	121	0	121	0	100
161	16	123	Poly C (5)	13	15	123	0	123	0	100
162	17	119	-	13	15	119	0	119	0	100
163	17	119	61% GC	13	15	119	0	119	0	100
164	17	135	-	13	15	135	0	135	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60% GC; SNV	13	15	116	0	116	0	100
166	17	123	-	13	15	123	0	123	0	100
167	17	116	62% GC	13	15	116	0	116	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
168	17	118	Poly C (5); 65% GC	13	15	118	0	118	0	100
169	17	129	-	13	15	129	0	129	0	100
170	17	131	Poly G (6); 67% GC; SNV	13	15	131	0	131	0	100
171	17	127	61% GC	13	15	127	0	127	0	100
172	17	118	Poly C (5)	13	15	118	0	118	0	100
173	17	138	61% GC	13	15	138	0	138	0	100
174	17	131	58% GC	13	15	131	0	131	0	100
175	18	112	-	13	15	112	0	112	0	100
176	18	124	-	13	15	124	0	124	0	100
177	18	134	Poly A (6)	13	15	134	0	134	0	100
178	18	129	-	13	15	129	0	129	0	100
179	18	133	-	13	15	133	0	133	0	100
180	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
181	18	114	60% GC	13	15	114	0	114	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
182	18	118	-	13	15	118	0	118	0	100
183	19	122	Poly G (6); 66% GC	13	15	122	0	122	0	100
184	19	139	64% GC	13	15	139	0	139	0	100
185	19	131	67% GC	13	15	131	0	131	0	100
186	19	141	59% GC; Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	141	0	141	0	100
187	19	121	Poly C (5); 72% GC; Regioni omologhe su un cromosoma diverso	13	15	121	0	121	0	100
188	19	138	58% GC	13	15	138	0	138	0	100
189	19	123	64% GC	13	15	123	0	123	0	100
190	19	138	-	13	15	138	0	138	0	100

Amplicone	Cromosoma	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni unici	N. totale di campioni analizzati[2]	N. di identificazioni per campione che è stato possibile effettuare[3]	N. di identificazioni non riuscite[4]	N. di identificazioni corrette per campione[5]	N. di identificazioni errate[6]	% di identificazioni corrette[7]
191	20	117	Poly T (5)	13	15	117	0	117	0	100
192	22	136	Poly A (7)	13	15	136	0	136	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	13	15	122	0	122	0	100
194	22	122	62% GC; SNV	13	15	122	0	122	0	100
195	22	119	66% GC	13	15	119	0	119	0	100

[1] Frammenti analizzati indica la dimensione della regione genomica sequenziata in basi, non sono inclusi i primer specifici per il target.

[2] N. totale dei campioni elencati è 15 perché due dei 13 campioni unici analizzati sono stati analizzati in due replicati indipendenti.

[3] N. identificazioni/campione che è stato possibile effettuate rappresenta il numero di basi che presentavano una qualità adeguata per essere identificate dal sistema.

[4] N. di identificazioni non riuscite rappresenta il numero di basi in un amplicone che non sono state identificate nella corsa.

[5] N. di identificazioni corrette per campione rappresenta il numero di basi nell'amplicone che sono state individuate e che hanno fornito risultati che corrispondevano alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19 e al riferimento composito ben caratterizzato.

[6] N. di identificazioni errate rappresenta il numero totale di identificazioni non corrette per SNV o Indel in quell'amplicone; le note a piè di pagina sottostanti forniscono ulteriori dettagli sulle identificazioni non corrette.

[7] La % di identificazioni corrette è pari alla percentuale di identificazione corretta per tutte le basi nell'amplicone, dove l'identificazione corretta per SNV o Indel si basa sulle informazioni dei riferimenti compositi ben caratterizzati e l'identificazione corretta per le basi nella restante sequenza dell'amplicone si basa sul confronto con la sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Questa colonna potrebbe presentare più di un risultato previsto per un dato amplicone se alcuni campioni contengono un Indel o no, ad esempio, amplicone 9. La % di identificazioni corrette per i campioni con un risultato non corretto è presentata nella tabella.

[8] L'amplicone 9 presenta una corsa per omopolimeri di 14 A in base alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Tuttavia, le informazioni per il riferimento composito ben caratterizzato per 7 dei 13 campioni presentano 13 A in questa corsa per omopolimeri. In questi 7 campioni, questa delezione di una coppia di basi rappresenta un falso negativo nello studio di accuratezza del sequenziamento MiSeqDx.

[9] L'amplicone 46 presenta un'inserzione di una base che viene riportata nei 9 campioni nel database dei riferimenti ben caratterizzati e viene rilevata correttamente in tutti i campioni analizzati.

[10] L'amplicone 95 presenta una corsa per omopolimeri di 14 A in base alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Tuttavia, le sequenze per il riferimento composito ben caratterizzato per 13 dei 13 campioni presentano 15 A in questa corsa per omopolimeri. In questi 13 campioni, questa inserzione di una coppia di basi rappresenta un falso negativo nello studio di accuratezza del sequenziamento MiSeqDx.

La tabella seguente contiene i dati dallo Studio 1 presentati con una percentuale di concordanza positiva e negativa, dove i risultati delle varianti sono confrontati sulle informazioni dei riferimenti compositi ben caratterizzati per i calcoli PPA. Poiché le informazioni dei riferimenti compositi forniscono solo risultati per le varianti di singolo nucleotide e inserzioni/delezioni, i risultati delle basi non varianti sono confrontati alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19, per i calcoli NPA. Tutte le basi non varianti presentano una concordanza del 100% con la sequenza di riferimento. Tutte le SNV presentano una concordanza del 100% con la sequenza di riferimento. Le varianti che non sono state identificate erano inserzioni di 1 base o delezioni di 1 base nelle regioni omopolimeriche.

Tabella 14 Concordanza dei risultati di identificazione delle basi sulla piattaforma MiSeqDx con i dati di riferimento per 13 campioni ben caratterizzati

Campione	N. di ampliconi	% di copertura degli ampliconi[1]	Varianti previste per campione[2]	Varianti identificate correttamente	Varianti non identificate[3]	Basi non varianti identificate correttamente	PPA[4] (%)	NPA[5] (%)
NA12877	195	100	19	17	2	24418	89.47	100
NA12878	195	100	19	17	2	24417	89.47	100
NA12879	195	100	20	19	1	24416	95.00	100
NA12880	195	100	20	18	2	24417	90.00	100
NA12881	195	100	22	20	2	24415	90.91	100
NA12882	195	100	16	15	1	24419	93.75	100
NA12883	195	100	24	23	1	24412	95.83	100
NA12884	195	100	21	20	1	24415	95.24	100
NA12885	195	100	19	17	2	24417	89.47	100
NA12886	195	100	22	20	2	24415	90.91	100
NA12887	195	100	19	18	1	24416	94.74	100
NA12888	195	100	24	23	1	24412	95.83	100
NA12893	195	100	20	18	2	24417	90.00	100

[1] % di copertura degli ampliconi rappresenta il numero di basi negli ampliconi sequenziate con affidabilità.
[2] Varianti previste per campione include sia le SNV che gli Indel.
[3] Per le varianti non identificate, vedere la prima tabella per lo Studio 1 e le note a piè di pagina 8-10.

[4] Percentuale di concordanza positiva (PPA) = 100xTP/(TP+FN) dove i veri positivi (TP) rappresentano il numero di identificazioni delle varianti positive a coordinate genomiche in cui le varianti sono presenti in base alla sequenza di riferimento e l'allele mutante identificato concorda con la sequenza di riferimento (colonna denominata "Varianti identificate correttamente") e i falsi negativi (FN) rappresentano il numero di identificazioni delle varianti negative a coordinate genomiche in cui le varianti sono presenti in base alla sequenza di riferimento (colonna denominata "Varianti identificate").

[5] Percentuale di concordanza negativa (NPA) = 100xTN/(FP+TN) dove i falsi positivi (FP) rappresentano il numero di identificazioni delle varianti positive a coordinate genomiche in cui le varianti sono assenti in base alla sequenza di riferimento o se l'allele mutante identificato è discordante con la sequenza di riferimento (non nella tabella; in questo studio non sono state eseguite identificazioni delle varianti falso positive) e veri negativi (TN) rappresentano il numero di identificazioni delle varianti negative a coordinate genomiche in cui le varianti sono assenti in base allo standard di riferimento (colonna denominata "Basi non varianti identificate correttamente").

Studio 2

I risultati del sequenziamento per il pannello degli ampliconi sopra indicato sono stati confrontati con un genotipo altamente affidabile per NA12878 dal National Institutes of Standards and Technology (NIST) (v.2.15[1]). Dei 195 ampliconi, 184 ampliconi rientravano nelle identificazioni di riferimento altamente affidabili nella sequenza NIST ed erano stati confrontati. Le identificazioni di basi non varianti sono state confrontate con la sequenza di riferimento del genoma umano versione 19.

Tabella 15 Confronto dei risultati del sequenziamento sulla piattaforma MiSeqDx per il campione NA12878 con il database NIST

Campione	N. di ampliconi	% di copertura degli ampliconi[2]	Varianti previste	Varianti identificate correttamente	Varianti non identificate	Basi non varianti identificate correttamente	PPA[3] (%)	NPA[4] (%)
NA12878	184	100	17	16	1[5]	23066	94.12	100

[1] Zook, JM et al. Integrating sequencing datasets to form highly confident SNP and indel genotype calls for a whole human genome. arXiv:1307.4661 [q-bio.GN].

[2] % di copertura degli ampliconi rappresenta il numero di basi negli ampliconi sequenziate con affidabilità.

[3] Percentuale di concordanza positiva (PPA) = 100xTP/(TP+FN).

[4] Percentuale di concordanza negativa (NPA) = 100xTN/(FP+TN)

[5] La variante non identificata rappresenta la delezione di una coppia di basi nell'amplicone 9 nella corsa di omopolimeri di 14 A non identificata da MiSeqDx che è presente nella sequenza NIST. Prestare attenzione che la sequenza NIST non include l'inserzione di una coppia di basi nell'altro omopolimero di A che era presente nell'altro database di riferimento usato sopra nello Studio 1.

I dati forniti da questi studi di accuratezza supportano l'asserzione che la piattaforma MiSeqDx può sequenziare accuratamente:

- Contenuto GC ≥ 19% (tutte le basi in 135 dei 135 ampliconi sequenziati con 19% di contenuto GC identificato correttamente)
- Contenuto GC ≤ 72% (tutte le basi in 135 dei 135 ampliconi sequenziati con 72% di contenuto GC identificato correttamente)
- Lunghezze PolyA ≤ 7 (ripetizione PolyA di 7 nucleotidi era stata identificata correttamente in 270 dei 270 ampliconi sequenziati contenenti PolyA =7)
- Lunghezze PolyT ≤ 8 (ripetizione PolyT di 8 nucleotidi era stata identificata correttamente in 270 dei 270 ampliconi sequenziati contenenti PolyT =8)
- Lunghezze PolyG ≤ 6 (ripetizione PolyG di 6 nucleotidi era stata identificata correttamente in 405 dei 405 ampliconi sequenziati contenenti PolyG =6)
- Lunghezze PolyC ≤ 7 (ripetizione PolyC di 7 nucleotidi era stata identificata correttamente in 135 dei 135 ampliconi sequenziati contenenti PolyC =7)

- Lunghezze di dinucleotidi ripetuti ≤ 5x (tutte le basi in 135 dei 135 ampliconi sequenziati con 5x di ripetizione di dinucleotidi sono state identificate correttamente)
- Lunghezze di trinucleotidi ripetuti ≤ 4x (tutte le basi in 810 dei 810 ampliconi sequenziati con 4x di ripetizione di trinucleotidi sono state identificate correttamente)
- Inserzioni di 1 base e delezioni di 3 o meno basi
  - 2 delle 3 inserzioni di 1 base testate sono state identificate correttamente. Le identificazioni corrette sono state fatte per due inserzioni di 1 base in regioni non omopolimeriche in 82 ampliconi. Un'inserzione di 1 base non era stata identificata in una corsa per omopolimeri di 14 A su cromosoma 2 in 135 ampliconi.
  - 3 delle 4 delezioni di 1 base sono state identificate correttamente. Tutte le identificazioni corrette sono state eseguite in regioni non omopolimeriche in 4 ampliconi. Una delezione di 1 base non era stata identificata in una corsa per omopolimeri di 14 A su cromosoma 9 in 63 ampliconi.
  - Le delezioni di 2 basi sono state identificate correttamente in un campione.
  - Le delezioni di 3 basi sono state identificate correttamente in 21 campioni.

Riproducibilità

La riproducibilità della piattaforma MiSeqDx è stata determinata usando due saggi rappresentativi.

Studio 1

È stato progettato un saggio rappresentativo per interrogare una varietà di geni che coprono 24.434 basi su 19 diversi cromosomi e che contengono potenzialmente gli esoni rilevanti dal punto di vista clinico. Lo studio ha esaminato 13 campioni su nove corse usando tre diversi strumenti MiSeqDx e tre diversi operatori (Tabella 16). Sono stati usati un singolo lotto di reagenti per la preparazione della libreria e due lotti di materiali di consumo per il sequenziamento. I 13 campioni erano stati prelevati da due genitori e 11 bambini. Questi campioni sono spesso stati sottoposti a sequenziamento da laboratori multipli e metodi di sequenziamento multipli. Due campioni sono stati analizzati in duplicati, in questo modo ciascuna corsa ha generato risultati per 15 campioni.

Per la valutazione della riproducibilità da lotto a lotto, sono stati analizzati 94 campioni e due controlli non templati su tre lotti. Ciascun lotto è stato diviso in corse da 48 campioni per testare tutti i reagenti e le possibili combinazioni di primer indice. Tutte le corse di sequenziamento sono state completate da un singolo operatore e su un singolo strumento MiSeqDx per rimuovere qualsiasi potenziale variazione da parte dell'operatore o dello strumento (Tabella 17).

Le identificazioni corrette sono state determinate per le varianti di singolo nucleotide (SNV) confrontando i dati dello studio su informazioni dei riferimenti ben caratterizzati. Per lo studio di riproducibilità non si sono verificate corse non riuscite o corse ripetute. Le tabelle seguenti mostrano i risultati degli studi per valutare la riproducibilità del sistema.

Tabella 16 Studio 1 - Risultati sulla riproducibilità da strumento a strumento per la piattaforma MiSeqDx (a livello di ampliconi)

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
1	1	132	Poly C (5); 63% GC	135	0	0	100	23[6]	0	99.61[7]	39[6]	0	99.34[7]
2	1	128	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
3	2	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
4	2	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
5	2	127	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
6	2	135	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
7	2	122	Poly T (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
8	2	110	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
9	2	131	Poly A (14)	135	0	27[8]	99.54	0	27[8]	99.54	0	27[8]	99.54
10	2	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
11	2	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
12	2	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
13	2	129	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
14	3	131	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
15	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
16	3	130	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
17	3	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
18	3	136	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
19	3	131	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
20	3	123	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
21	3	117	Poly A (6); Poly T (5); Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
22	3	119	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
23	3	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
24	3	129	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
25	4	133	Poly C (7); 66% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
26	4	135	Poly C (5); 69% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico o dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
27	4	123	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
28	4	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
29	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
30	4	121	Poly A (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
31	4	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
32	4	134	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
33	4	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
34	4	122	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
35	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
36	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
37	4	128	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
38	4	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Ampli cone	Cr o m.	Dimen sione del framm ento analizz ato[1]	Contenu to genomic o dell'amp licone	N. di camp ioni anali zzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identific azioni non riuscite[3]	N. totale di identific azioni errate[4]	% di identific azioni corrette[5]	N. totale di identific azioni non riuscite[3]	N. totale di identific azioni errate[4]	% di identific azioni corrette[5]	N. totale di identific azioni non riuscite[3]	N. totale di identific azioni errate[4]	% di identific azioni corrette[5]
39	4	129	Poly A (5); Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
40	4	133	Poly T (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
41	4	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
42	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
43	4	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
44	4	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
45	4	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
46	4	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
47	4	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
48	4	128	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
49	4	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
50	4	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
51	4	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
52	4	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
53	4	126	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
54	4	132	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
55	5	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
56	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
57	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
58	5	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
59	5	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
60	5	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
61	5	120	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
62	5	120	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
63	5	115	CT(5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
64	5	112	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
65	5	135	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
66	5	131	63% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
67	5	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
68	5	132	Poly A (6); Poly T (8)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
69	7	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
70	7	120	60% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
71	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
72	7	126	Poly A (5); 59% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
73	7	134	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
74	7	122	Poly C (5); 63% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
75	7	127	59% GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
76	7	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
77	7	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
78	7	133	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
79	7	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
80	7	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
81	7	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
82	7	136	67% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
83	7	131	58% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
84	7	119	Poly G (6); 61% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
85	7	122	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
86	7	123	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
87	8	127	60% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
88	8	129	57% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
89	9	130	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
90	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
91	9	119	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
92	9	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
93	9	117	Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
94	9	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
95	9	129	Poly A (14)	135	0	45[9]	99.22	0	45[9]	99.22	0	45[9]	99.22

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
96	9	114	Regioni omologhe su un cromosoma diverso; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
97	9	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
98	9	127	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
99	9	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
100	9	138	64% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
101	9	139	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
102	9	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
103	9	133	Poly A (5); 57% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
104	9	138	57% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
105	9	136	Poly C (5); 67% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
106	9	118	70% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
107	10	128	62% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
108	10	120	60% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
109	10	139	58% GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
110	10	118	57% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
111	10	123	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
112	10	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
113	10	129	26% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
114	10	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
115	10	124	Poly T (5); Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
116	10	135	CA(4)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
117	10	135	Poly A (6); Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
118	10	119	Poly C (5); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
119	10	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
120	10	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
121	10	117	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
122	10	116	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
123	10	129	58% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
124	11	117	Poly T (10)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
125	11	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
126	11	113	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
127	11	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
128	11	121	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
129	11	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
130	11	127	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
131	11	136	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
132	11	132	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
133	11	115	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
134	11	117	Poly T (8); 19% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
135	11	134	Poly A (5); Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
136	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
137	11	133	SNV; 26% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
138	11	137	Poly T (8); SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
139	11	131	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
140	12	131	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
141	12	128	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
142	12	133	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
143	12	136	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
144	12	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
145	12	122	59% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
146	13	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
147	13	116	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
148	13	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
149	13	117	SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
150	13	124	Poly T (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
151	13	123	Poly T (5); 26% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
152	13	115	Poly A (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
153	13	125	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
154	13	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
155	13	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
156	13	114	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
157	13	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
158	14	122	58% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
159	16	122	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
160	16	121	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
161	16	123	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
162	17	119	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
163	17	119	61% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
164	17	135	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
165	17	116	Poly C (6); 60% GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
166	17	123	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
167	17	116	62% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
168	17	118	Poly C (5); 65% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
169	17	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
170	17	131	Poly G (6); 67% GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
171	17	127	61% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
172	17	118	Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
173	17	138	61% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
174	17	131	58% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
175	18	112	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
176	18	124	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
177	18	134	Poly A (6)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
178	18	129	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
179	18	133	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
180	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
181	18	114	60% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
182	18	118	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
183	19	122	Poly G (6); 66% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
184	19	139	64% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
185	19	131	67% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
186	19	141	59% GC; Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
187	19	121	Poly C (5); 72% GC; Regioni omologhe su un cromosoma diverso	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
188	19	138	58% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

Amplicone	Crom.	Dimensione del frammento analizzato[1]	Contenuto genomico dell'amplicone	N. di campioni analizzati[2]	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2			MiSeqDx 3		
					N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]	N. totale di identificazioni non riuscite[3]	N. totale di identificazioni errate[4]	% di identificazioni corrette[5]
189	19	123	64% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
190	19	138	-	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
191	20	117	Poly T (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
192	22	136	Poly A (7)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
193	22	122	Poly A (5); Poly C (5)	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
194	22	122	62% GC; SNV	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100
195	22	119	66% GC	135	0	0	100	0	0	100	0	0	100

[1] Frammenti analizzati indica la dimensione della regione genomica sequenziata in basi, non sono inclusi i primer specifici per il target.
[2] Numero di campioni è calcolato da 9 corse di 15 campioni (una volta la corsa da 11 campioni e due volte la corsa da 2 campioni).
[3] Numero totale di identificazioni non riuscite rappresenta il numero combinato di mancate identificazioni ottenute per tutte le 45 corse che analizzavano l'amplicone specifico usando uno strumento MiSeqDx specifico.
[4] Numero totale di identificazioni errate rappresenta il numero combinato di identificazioni errate ottenute per tutte le 45 corse che analizzavano l'amplicone specifico usando uno strumento MiSeqDx specifico.
[5] La % di identificazioni corrette è pari alla percentuale di identificazioni corrette per tutte le basi nell'amplicone, dove l'identificazione corretta per SNV o Indel si basa sul database dei riferimenti compositi ben caratterizzati e l'identificazione corretta per le basi nella restante sequenza dell'amplicone si basa sul confronto con la sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Questa colonna potrebbe presentare più di un risultato previsto per un dato amplicone se per alcuni campioni è prevista la presenza di uno o più Indel, ad esempio, amplicone 9.
[6] L'amplicone 1 presentava diverse basi il cui genotipo non è stato possibile identificare: 12 basi nelle corse 1/9 in NA12881; 1 base nelle corse 2/9 e 3 basi nelle corse 1/9 in NA12886; 20 basi nelle corse 1/9 e 26 basi nelle corse 1/9 in NA12888. Questo è dovuto alla copertura bassa a basi con identificazione non riuscita in quelle corse, dove la profondità di sequenziamento media era di 33,2, con un minimo di 21 e un massimo di 52.

[7] Quando le identificazioni non riuscite non vengono incluse nel calcolo, la percentuale di identificazioni corrette è del 100%.

[8] L'amplicone 9 presenta una corsa per omopolimeri di 14 A in base alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Tuttavia, le informazioni del riferimento ben caratterizzato per 7 dei 13 campioni presentano 13 A in questa corsa per omopolimeri. In questi 7 campioni, questa delezione di una coppia di basi è chiamata un falso negativo e viene chiamata come falso negativo riproducibile in tutte e nove le corse.

[9] L'amplicone 95 presenta una corsa per omopolimeri di 14 A in base alla sequenza di riferimento del genoma umano versione 19. Tuttavia, le sequenze del riferimento composito ben caratterizzato per 13 dei 13 campioni presentano 15 A in questa corsa per omopolimeri. In questi 13 campioni, questa inserzione di una coppia di basi non è identificata ed è riproducibile al 100% (ad es., è un falso negativo).

I risultati dello Studio 1 sulla riproducibilità per ciascun campione sono mostrati combinati in una colonna da tutte le nove corse. I risultati visualizzati sono solo esclusivamente per le varianti di singolo nucleotide e per i risultati di inserzioni/delezioni rispetto alla sequenza del database di riferimento per tre corse su tre strumenti. Questa analisi dimostra che i risultati per le varianti sono riproducibili, per questi campioni, su nove corse.

Tabella 17 Riepilogo dei risultati di riproducibilità della piattaforma MiSeqDx per 13 campioni ben caratterizzati

N. DNA	ID campione di DNA	N. di corse per campione	N. di SNV	Varianti di singolo nucleotide (SNV)			N. di Indel	Inserzioni/delezioni (Indel)		
				N. di identificazioni corrette	N. di falso positivi[1]	N. di falso negativi[2]		N. di identificazioni corrette	N. di falso positivi[1]	N. di falso negativi[2]
1	NA12877[3]	18	16	16	0	0	3	1	0	2
2	NA12878[3]	18	17	17	0	0	2	0	0	2
3	NA12879	9	18	18	0	0	2	1	0	1
4	NA12880	9	17	17	0	0	3	1	0	2
5	NA12881	9	19	19	0	0	3	1	0	2
6	NA12882	9	15	15	0	0	1	0	0	1
7	NA12883	9	22	22	0	0	2	1	0	1
8	NA12884	9	19	19	0	0	2	1	0	1
9	NA12885	9	17	17	0	0	2	0	0	2
10	NA12886	9	19	19	0	0	3	1	0	2
11	NA12887	9	18	18	0	0	1	0	0	1
12	NA12888	9	22	22	0	0	2	1	0	1
13	NA12893	9	17	17	0	0	3	1	0	2

[1] Falso positivo = Variante identificata dalla corsa di sequenziamento MiSeqDx ma non presente nel database di riferimento.
[2] Falso negativo = Variante presente nel database di riferimento ma non identificata nella corsa di sequenziamento MiSeqDx.
[3] I campioni NA12877 e NA12878 sono stati analizzati in duplicati. I campioni replicati hanno generato risultati identici.

Studio 2

Uno studio di riproducibilità da centro a centro eseguito con un saggio rappresentativo, il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis 139 Variant Illumina, includeva un sotto gruppo di variazioni genetiche di *CFTR* significative dal punto di vista clinico analizzate con il software MiSeq Reporter usando il flusso di lavoro per il sequenziamento del DNA target sulla piattaforma MiSeqDx. Lo studio in cieco usava 3 centri per il trial e 2 operatori in ciascun laboratorio. Due pannelli ben caratterizzati di 46 campioni ciascuno sono stati testati da ciascun operatore in ciascun centro per un totale di 810 identificazioni per centro. I panelli erano costituiti da una miscela di DNA genomico proveniente da linee cellulari con varianti note del gene *CFTR*, oltre che da sangue deleucocitato con aggiunta di linee cellulari con varianti note del gene *CFTR*. I campioni di sangue servivano per consentire l'incorporazione delle fasi di estrazione necessarie per preparare il gDNA utilizzato come input primario per il flusso di lavoro del saggio. La percentuale dei campioni "pass", vale a dire il numero di campioni che hanno superato la metrica QC al primo tentativo, è stato del 99,88%. Tutti i risultati del test sono basati su test iniziali.

Tabella 18 Riepilogo dei risultati dello studio di riproducibilità eseguito con un saggio rappresentativo MiSeqDx Cystic Fibrosis 139-Variant

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4[1]	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1[1]	100	100	100
A	5[2]	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135[2]	94.44	94.44	94.44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9[3]	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2[3]	0	97.22	99.96	99.92
A	10[3]	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2[3]	0	97.22	99.96	99.92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C non presente	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG) 10(T) 9/ (TG) 12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG) 10(T) 9/ (TG) 12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/1898+1G >A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72[4]	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1[4]	100	99.96	99.96
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75[2]	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135[2]	94.44	94.44	94.44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Pannello	N. di campioni	Genotipo del campione	Varianti	Identificazioni totali per centro	Identificazioni con concordanza positiva (varianti)			Identificazioni con concordanza negativa (wild type)			N. di identificazioni errate	N. di identificazioni non riuscite	Concordanza positiva (%)	Concordanza negativa (%)	Concordanza complessiva (%)
					Centro 1	Centro 2	Centro 3	Centro 1	Centro 2	Centro 3					
B	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/F508del (HET)	(TG) 10(T) 9/ (TG) 12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	86[4]	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1[4]	100	99.96	99.96
B	87	F508del/1898+1G >A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N.D.	100	100
B	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
totali				74556	2209			221182			4	273	99.77	99.88	99.88

[1] La posizione del wild type corrispondente alla variante N1303K per un replicato ha prodotto un'identificazione non riuscita a causa della coperture insufficiente.

[2] Un replicato dei campioni 5 e 75 ha registrato una percentuale di identificazione dello 0%. Ulteriore investigazione indica che i campioni potrebbero non essere stati aggiunti alla piastra campioni prima della preparazione della libreria perché i volumi dei campioni rimanenti nelle provette erano coerenti con nessun volume rimosso.
[3] Evidenze empiriche indicano che probabilmente i campioni 9 e 10 sono stati scambiati dall'operatore prima della preparazione della libreria.
[4] La posizione del wild type corrispondente alla variante M1V per un replicato di ciascuno dei due campioni ha prodotto un'identificazione non riuscita a causa della coperture insufficiente.

Estrazione del DNA

Tre diversi metodi di estrazione, estrazione con microsfere magnetiche, precipitazione alcolica e isolamento mediante colonna di gel di silice, sono stati valutati utilizzando sangue intero anticoagulato in K_2EDTA. In questo studio sono stati usati quattordici campioni di sangue unici che rappresentano una gamma di genotipi da un gene rappresentativo. I tre metodi di estrazione del DNA sono stati analizzati indipendentemente da 2 diversi operatori e ciascuno di loro ha eseguito 3 corse per ciascun metodo di estrazione. Ciascuna estrazione è stata eseguita da ciascun operatore in giorni diversi. La concentrazione di DNA e il rapporto A260/A280 dei campioni di gDNA estratto sono stati determinati usando spettrofotometria. La dimensione complessiva del campione per ciascun metodo di estrazione esaminato nello studio è stato pari a 168 (14 campioni x 2 operatori/metodo di estrazione x 3 corse/operatore x 2 replicati/campioni di gDNA estratto).

Metodo di estrazione	Numero di campioni analizzati	Percentuale di identificazione	Accuratezza[1]	Percentuale di campioni "first pass"[2]
Precipitazione alcolica	168	100%	100%	100%
Isolamento su colonna di gel di silice	168	100%	100%	100%
Estrazione con microsfere magnetiche	168	100%	100%	100%

[1]Accuratezza - La percentuale di concordanza con un metodo di analisi di riferimento (sequenziamento bidirezionale Sanger) calcolata per quelle posizioni delle basi che hanno ottenuto un'identificazione delle basi.
[2]Percentuale di campioni "first pass" - Il numero di campioni che corrispondono alla percentuale di identificazione specificata la prima volta che sono elaborati (senza la necessità di ripetere la corsa o elaborazione ulteriore) sottoforma di una percentuale del numero totale dei campioni analizzati durante un singolo esperimento di sequenziamento MiSeqDx.

Input di DNA

La gamma di input di DNA per la piattaforma MiSeqDx è stata valutata eseguendo uno studio di diluizione in serie usando 14 campioni di DNA rappresentativi che contenevano 16 singole varianti del gene uniche. Ciascun campione è stato analizzato in duplicati a 9 livelli di input di DNA che andavano da 1250 ng a 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng). Per la determinazione dell'accuratezza, i genotipi dei campioni sono stati confrontati con i dati ottenuti dal sequenziamento bidirezionale Sanger. 1250 ng e 25 ng sono stati identificati come il legame superiore e inferiore per l'input di DNA rispettivamente in quanto hanno ottenuto una percentuale di campioni "first pass" del ≥95% senza identificazioni non corrette (100% di accuratezza e percentuale di identificazione).

Gli input di DNA di 1250 ng, 250 ng e 100 ng sono stati ulteriormente analizzati con 4 campioni di DNA rappresentativi e 20 replicati per ciascun livello di input di DNA per ciascun campione (n=4*20=80 campioni), mentre il legame inferiore di 25 ng è stato analizzato con 14 campioni, 20 replicati per ciascun campione (n=14*20=280 campioni). L'accuratezza e la percentuale di campioni "first pass" sono risultati pari al 100% a tutti i livelli di input di DNA e percentuale di identificazione dei campioni di >99%.

Sostanze interferenti

Per valutare l'impatto delle sostanze interferenti sulla piattaforma MiSeqDx, un saggio rappresentativo progettato per interrogare un gene singolo che copre 11.529 basi è stato valutato in presenza o in assenza di potenziali sostanze interferenti. Nello studio sono stati usati otto campioni di sangue intero che rappresentavano otto genotipi unici. Quattro sostanze interferenti endogene (bilirubina, colesterolo, emoglobina e trigliceride) sono state testate aggiungendole ai campioni di sangue prima dell'estrazione del DNA. Per valutare l'interferenza risultante dalla

raccolta del sangue (prelievo breve), EDTA è stato aggiunto ai campioni di sangue in due concentrazioni. I limiti di concentrazione di ciascuna sostanza sono riportati nella tabella seguente. Inoltre, per valutare l'interferenza risultante dalla preparazione dei campioni, è stato aggiunto 15% di tampone di lavaggio a 8 DNA genomici purificati. È stata raggiunta una percentuale di identificazione del 100% per tutti i campioni analizzati oltre a una riproducibilità del 100% nell'identificazione dei genotipi tra i campioni in presenza o in assenza delle sostanze interferenti.

Sostanza del test	Numero totale di replicati	Concentrazione analizzata nel sangue (limite superiore)	Concentrazione analizzata nel sangue (limite inferiore)	Percentuale di identificazione
Bilirubina	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100%
Colesterolo	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100%
Emoglobina	16	2 g/l	0,4 g/l	100%
Trigliceride	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100%
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100%

Indicizzazione del campione

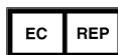
I primer indice dei campioni sono utilizzati nel kit per assegnare un codice a barre univoco a ciascun campione di DNA, consentendo di raggruppare in un pool più campioni in una singola corsa di sequenziamento.

Sono stati analizzati complessivamente 96 indici di campioni mediante un saggio rappresentativo progettato per interrogare un gene singolo che copre 11.529 basi con 8 campioni di DNA unico al fine di verificare la capacità del saggio di identificare i genotipi in modo coerente per un dato campione fra diverse combinazioni di primer di indicizzazione. Ciascun campione è stato analizzato con 12 diverse combinazioni di primer di indicizzazione. Quarantotto (48) combinazione di indici sono state analizzate in una corsa di sequenziamento. I risultati dei campioni sono stati confrontati con i dati ottenuti dal sequenziamento bidirezionale Sanger per tutte le posizioni/varianti. Riproducibilità e accuratezza sono risultate del 100% per tutte le combinazioni di primer indice/campione.

Brevetti e marchi registrati

Informazioni di contatto

Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH L'Aia
Paesi Bassi

CE

Etichettatura del prodotto

Fare riferimento alla chiave dei simboli spediti con ciascun kit per un riferimento completo ai simboli che possono apparire sulla confezione e sull'etichettatura del prodotto.